

UNTERSUCHUNGEN ZUM SÄURESPEKTRUM
IN DER PLAQUE NACH ZUCKERSPÜLUNG
IN VIVO

von
Ingo Lang
aus
Schwandorf

1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546222_0071

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. A. Kröncke

UNTERSUCHUNGEN ZUM SÄURESPEKTRUM IN DER PLAQUE NACH ZUCKERSPÜLUNG IN VIVO

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich - Alexander - Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Ingo Lang

aus

Schwandorf

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. V. Becker
Referent: Prof. Dr. A. Kröncke

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.1981

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung und Problemstellung	2
II. Literaturübersicht	7
A. Der Begriff "Plaque" in der Literatur - Definition	7
B. Theorien der Kariesentstehung	8
C. Plaque als zentraler Faktor der Kariogenese	10
1. Entstehung der Plaque	10
2. Stoffwechselvorgänge	12
3. Plaqueuntersuchungen	15
III. Material und Methoden	18
A. Zur methodischen Problematik	18
B. Versuchsvorbereitung	18
C. Plaqueentnahme	19
D. Zuckerspülversuche	20
E. Weiterverarbeitung der Plaqueproben	20
F. Überführung der Na-Salze in die Naphtacylester	20
G. Chromatographische Trennung	22
IV. Ergebnisse	26
V. Diskussion	38
VI. Zusammenfassung	43
VII. Literatur	44

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Schon immer war es das Bestreben des Menschen, die Vorgänge in seiner Umgebung zu untersuchen und aufzuklären. Das gilt auch für die physiologischen Vorgänge in seinem eigenen Körper und in gleichem Maße auch für seine Krankheiten. Die Karies, schon seit dem Beginn schriftlicher Aufzeichnungen der Menschheitsgeschichte als Krankheit überliefert, hat sich immer mehr zu einer Volkskrankheit ersten Ranges entwickelt. Deshalb wurden in den letzten Jahrzehnten mit großem Nachdruck Versuche unternommen, mit naturwissenschaftlich-technischen Methoden der Ätiologie und den Mechanismen der Entstehung von Karies auf die Spur zu kommen, nicht zuletzt begünstigt durch die stürmische Entwicklung der Technik mit dem Ziel immer feinerer und genauerer Methoden zur Untersuchung von Naturvorgängen.

Nachdem man erkannt hat, daß Mikroorganismen in bestimmter Weise an der Entstehung der Karies beteiligt sind, befaßt sich der überwiegende Teil der Forschungsvorhaben mit diesem Gebiet im weitesten Sinne. Den kausalen Zusammenhang zwischen Mikroorganismen und Karies bewiesen die Tierexperimente von ORLAND et al. (1954, 1955), welche an keimfrei aufgezogenen Ratten zeigen konnten, daß trotz kariogener Nahrung ohne Mikroorganismen keine Karies entstand.

Zudem hat man herausgefunden, daß die Entstehung der Zahnplaques zum großen Teil auf die Stoffwechselleistungen der Mikroorganismen zurückzuführen sind. Die genaue Aufklärung dieser Stoffwechselleistungen steht im Mittelpunkt der wissenschaftlichen Kariesforschung, seit MILLER im Jahre 1884 seine chemisch-parasitäre Theorie der Zahnkaries postuliert hat. Seit ihm vermutet man - und die neuere Forschung scheint seine Theorie zu bestätigen -, daß Säuren in den Plaques als mikrobielle Metaboliten der Nahrung ursächlich für die Auflösung der Zahnhartsubstanzen sind.

Nach KEYES (1962) und KONIG (1971) sind drei bzw. vier ätiologische Faktoren für die Kariesentstehung gleichzeitig notwendig:

1. Der Wirtsorganismus mit seinen kariesanfälligen Zähnen
2. Mikroorganismen
3. Substrat für die Mikroorganismen
4. Zeit

Allerdings kann man auch beobachten, daß trotz Zusammentreffens aller dieser Faktoren keine Karies entsteht.

Es liegt nahe, daß zu diesem Phänomen wesentlich das "System Plaque" beiträgt, in dem sich die meisten mikrobiologischen Vorgänge abspielen. Plaques weisen keine einheitliche Zusammensetzung auf; sie variieren vielmehr von Individuum zu Individuum beträchtlich. Aber auch innerhalb einer Mundhöhle bestehen große Unterschiede in der Zusammensetzung, was die Art und Menge der Bakterien, den Protein- und Kohlenhydratgehalt und auch die anorganischen Bestandteile (Kalzium, Phosphat, Fluorid, Magnesium) anbelangt (BOSSMANN 1979a).

Plaque ist kein statisches, sondern ein sich ständig veränderndes System (JENKINS 1968, BIBBY 1968, CRITCHLEY und SAXTON 1970), das dauernd wechselnden Einflüssen seiner Umgebung unterliegt. Das heißt aber auch, daß die von den Mikroorganismen gebildeten Säuren nicht immer mit ihrer kariogenen Wirkung voll zum Tragen kommen. In der Plaque vorhandene Puffersysteme wie auch der Speichelfluß spielen hier eine wichtige Rolle. Die Entstehung von Karies scheint also an eine bestimmte Plaque unter bestimmten Einflüssen gebunden zu sein (BOSSMANN 1977). (Siehe auch Abb. 1).

Die Nahrung und darunter besonders die Kohlenhydrate sind als Substrat für die Plaquebakterien von zentraler Bedeutung für die Kariesentstehung. Das Dickenwachstum der Plaque erfolgt größtenteils durch Synthese von Speichelfeststoffen (extrazelluläre Polysaccharide, EPS), die in Zeiten verminderter

Kohlenhydratzufuhr genauso wie die ebenfalls als Substratspeicher dienenden intrazellulären Polysaccharide (IPS) wieder abgebaut werden (GIBBONS und SOCRANSKY 1962, WOOD 1967).

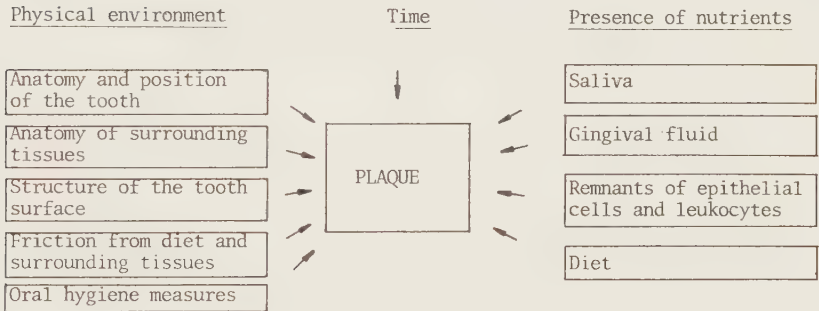


Abb. 1: Factors affecting the development of plaque (EGELBERG 1970)

Die Energiegewinnung der Bakterien erfolgt überwiegend auf folgende Weise:

- Spaltung von Nahrungskohlenhydraten und Abbau zu Säuren (anaerobe Glykolyse),
- Metabolisierung dieser Säuren letztlich zu CO_2 und Wasser.

Dabei übernehmen wahrscheinlich verschiedene Bakterienarten verschiedene Teilbereiche des Kohlenhydratabbaus.

Die Fragestellung, welche Bakterien in welchem Umfang welche Abbauwege durchführen, berührt die wichtigsten Teilbereiche der heutigen Kariesforschung.

Die Therapie einer Krankheit kann ohne Grundlagenforschung nur rein symptomatisch sein. Eine wirkungsvolle und dauerhafte Therapie ist letztlich nur eine, die die Ursachen beseitigt. Dazu aber ist es nötig, die ursächlichen Noxen zu erkennen. Wichtige Schritte dorthin sind Experimente, die mit gezielten Fragestellungen Einzelaspekte beleuchten.

In vitro Experimente besitzen gegenüber in vivo Untersuchungen die Vorteile der besseren Kontrollierbarkeit, der höheren Standardisierung und der Reproduzierbarkeit. Entscheidend für den Wert eines in vitro Experiments aber ist die Frage, ob der Versuchsaufbau die in vivo Situation richtig darstellt. Dazu gehört auch, ob alle Bedingungen erfaßt sind, wie sie unter natürlichen Verhältnissen gegeben sind, und ob die Wechselwirkungen der Einzelaspekte untereinander richtig beurteilt worden sind.

Inwieweit ist also die in vitro Situation auf die natürlichen Verhältnisse übertragbar? Zur Beantwortung dieser Frage und zur richtigen Beurteilung aller Komponenten sowohl in der Zusammensetzung als auch in ihrer Wechselwirkung untereinander sind Experimente an den lebenden Organismen selbst notwendig.

Diese allgemeinen Grundsätze gelten auch für die Kariesforschung. Nachdem der Einzelaspekt der Anwesenheit der von den verschiedensten Mikroorganismen in den Plaques gebildeten Säuren in vielfältiger Weise durch in vitro Versuche beleuchtet worden ist (MUNTZ 1943, RANKE et al. 1964, GEDDES und GILMOUR 1969, GEDDES 1972, TYLER 1975, DISTLER und KRÖNCKE 1978), werden jetzt folgerichtig diese Ergebnisse durch Untersuchungen mit Versuchsbedingungen, wie sie direkt in der Mundhöhle gegeben sind, überprüft.

In dieser Arbeit soll deshalb durch in vivo Untersuchungen festgestellt werden:

1. Welche Säuren sind nach einer Spülung mit einer Zuckerlösung in menschlicher Zahnplaque vorhanden?
2. In welchen Mengen kommen diese Säuren vor?
3. Verändern sich diese Mengen innerhalb einer Zeitspanne nach einer Spülung mit bestimmten Gesetzmäßigkeiten?

II. LITERATURÜBERSICHT

A. Der Begriff "Plaque" in der Literatur - Definition

"Plaque" wird im zahnmedizinischen Schrifttum zum ersten Mal von BLACK (1898) im Ausdruck "gelatineous microbic plaques" verwendet, um eine filzartige Masse von Mikroorganismen zu beschreiben, die WILLIAMS (1897) auf kariösem Zahnschmelz beobachtet hatte (CRITCHLEY et al. 1968).

MOORE und Mitarbeiter gaben im Rahmen einer Untersuchung eine weitgefaßte Definition von "Plaque", da die Zusammensetzung der Plaque und die Mechanismen ihrer Bildung noch nicht geklärt waren. Sie bezeichneten als Plaque jegliches Material, das ohne Berücksichtigung von Herkunft oder Zusammensetzung mit einem zahnärztlichen Instrument von der Zahnoberfläche abschabbar war (MOORE et al. 1956).

Im Jahre 1964 wurde auf einem Kariessymposium in Münster der Versuch unternommen, eine genauere Definition zu finden. Plaques wurden hier als "festhaftende Mukoproteidbeläge unter Beimengung von Nährsubstraten" beschrieben. SAUERWEIN präzierte in Anlehnung an RANKE den Begriff "festhaftend" dahingehend, daß er sagte, Plaques seien Beläge, die man durch einen kräftigen Wasserstrahl nur zu einem kleinen Teil abspülen könne (SAUERWEIN 1974). Da er aber keine Angaben darüber macht, was unter einem kräftigen Wasserstrahl zu verstehen ist, läßt auch diese Definition einen großen Ermessensspielraum.

EGELBERG schließlich erklärt sich auf einem Plaquesymposium 1970 in Dundee mit der Wasserstrahlmethode nicht einverstanden. Seiner Meinung nach würde durch den Wasserstrahl der äußere Teil der Beläge entfernt und damit in das komplexe System der Plaque ein Eingriff vollzogen, der das strukturelle und funktionelle Gleichgewicht zerstört. Zu Untersuchungen sollten nicht nur Teile der Plaque, ausgewählt nach physikalischen

Gegebenheiten, herangezogen werden, vielmehr sollte man Plaque als einen strukturellen und funktionellen Komplex betrachten (EGELBERG 1970).

"In bezug auf die Lokalisation, das Plaquealter, den Einfluß des äußeren Milieus - abhängig von Alter, Geschlecht und Gesundheitszustand der jeweiligen Person - variieren die Struktur, die mikrobielle und chemische Zusammensetzung sowie der Metabolismus, so daß von einer einheitlichen Plaque nicht gesprochen werden kann." Plaque wird daher als ein weißlicher, weicher, fest auf der Zahnoberfläche haftender Belag aus Mikroorganismen, Speichelbestandteilen und Nahrungsresten beschrieben (BOSSMANN 1979a).

Die Definition von BOSSMANN gilt auch als Grundlage für diese Arbeit, wobei aber die Zugehörigkeit von Nahrungsresten zur Plaque bestritten wird.

B. Theorien der Kariesentstehung

Im Laufe der letzten Jahrhunderte standen viele Überlegungen und Hypothesen über die Kariesentstehung zur Diskussion, jedoch haben die Ansichten mehr das Interesse des Historikers verdient, da sie heutigen wissenschaftlichen Ansprüchen in keiner Weise standhalten. Erst mit den Untersuchungen von W.D. MILLER in den Jahren 1884 - 1889 wurde die Kariesforschung auf ein wissenschaftliches Niveau angehoben, als er seine durch viele Experimente gestützte, heute als klassisch geltende chemoparasitäre Theorie der Kariogenese konzipierte. Sie wird von den meisten Forschern als allgemeingültig anerkannt und ist mehrfach ergänzt, aber noch nie widerlegt worden.

MILLER wies mit Lackmuspapier, das er in tiefe Kariesschichten gebracht hatte, den sauren Charakter kariöser Läsionen nach. Er schrieb damals:

"Die Zahncaries ist ein chemisch-parasitärer Vorgang, bestehend aus zwei deutlich ausgeprägten Stadien, der Entkalkung resp. Erweichung des Gewebes und der Auflösung des erweichten Rückstandes." "... der Erweichungsprocess ... (ist) eine Entkalkung durch Säuren ..." "Die Zerstörung der organischen Bestandteile des Zahnes findet nach (nicht vor) der Entkalkung statt und ist augenscheinlich der Tätigkeit der Pilze zuzuschreiben." (zit. nach SAUERWEIN 1974). Unter den Säuren machte er die Milchsäure als diejenige aus, der die Hauptrolle bei der Entkalkung der Zahnhartsubstanzen zufiel.

Neben der MILLER'schen Theorie wurden in den vergangenen Jahrzehnten verschiedene Modelle der Kariesentstehung entwickelt, die aber alle die Theorie MILLERS nicht widerlegen konnten. SAUERWEIN (1974) bietet dazu eine umfassende Übersicht.

GOTTLIEB (1921) vertrat die Meinung, daß vor der Entkalkung die Auflösung der organischen Grundsubstanzen stünde, und die Schmelzprismen erst später herausbrechen würden. Gegen dieses Modell der Kariesentstehung allein durch Proteolyse sprechen die elektronenmikroskopischen Untersuchungen des Kariesinitials. Es ist aber durchaus denkbar, daß Azidolyse und Proteolyse im Wechsel oder nebeneinander ablaufen, nachdem die Säure erste Auflösungserscheinungen vollbracht hat.

Eine weitere wichtige Theorie bildete die Proteolyse-Chelations-Theorie von SCHATZ (1954). Seiner Meinung nach finden zwei Vorgänge gleichzeitig statt:

1. Zerstörung der organischen Grundsubstanz durch proteolytische Bakterien
2. Chelatbildung mit den Calciumphosphaten des Schmelzes und zwar unabhängig vom pH-Wert. Allerdings fehlt ein schlüssiger Beweis für diese Theorie bis heute.

Unter den enzymologischen Theorien ist die Phosphatasetheorie von EGGERS-LURA (1949) hervorzuheben. Er sieht die Kariesentstehung als eine Art pathologischer Zahnresorption durch Phosphatasen des Speichels bei ungenügender Zufuhr von phosphorreicher Nahrung, so daß ein Mangel an labilen Phosphatesteren im Blut und Speichel entsteht.

Diese Theorien sind wissenschaftlich recht gut fundiert, jedoch kann keine sämtliche bisher beobachteten Phänomene der Kariesentstehung in allen Punkten vollständig erklären. Die azidolytische Theorie stimmt aber mit den meisten klinischen und experimentellen Befunden zur Zahnkaries überein (KÖNIG 1971). Das soll nicht heißen, daß nicht Teile der kariösen Läsionen aufgrund von Mechanismen entstehen, die durch andere Theorien beschrieben werden. Nach heutiger, weit überwiegend akzeptierter Auffassung spielen Auflösungsprozesse durch Säuren, die in der Plaque entstehen, die primäre und wesentliche Rolle bei der Genese der Zahnkaries.

C. Plaque als zentraler Faktor der Kariogenese

Schon bald wurde erkannt, daß die Karies unter den Zahnbelägen ihren Ursprung nimmt. Ein spezieller Teil der Forschung konzentrierte sich daher auf die Untersuchung dieser Plaques.

1. Entstehung der Plaque

Innerhalb von ein bis zwei Stunden bildet sich auf einer völlig gereinigten Schmelzoberfläche eines Zahnes im Mundmilieu ein gleichmäßig dünnes (BOSSMANN 1979a) Zahnoberhäutchen, das aus Glykoproteinen des umgebenden Speichels gebildet wird (LEACH et al. 1967, CRITCHLEY et al. 1968), wobei Calciumionen die Verbindung der organischen Moleküle herstellen (ROLLA 1973).

Nach ca. zwei Stunden lassen sich erste Mikroorganismen (Kokken) auf dem Zahnoberhäutchen nachweisen (SAXTON 1973, BOSSMANN 1979b). Das eigentliche Plaquewachstum beginnt hier mit der Anheftung und Vermehrung der Mikroorganismen, wobei das Dickenwachstum entscheidend durch die Fähigkeit mancher Bakterienarten bestimmt wird, extrazelluläre Polysaccharide (EPS) aus Zuckern zu synthetisieren (GUGGENHEIM 1968, CRITCHLEY 1971).

Die bakterielle Kolonisation erfolgt nicht wahllos. Man hat festgestellt, daß zuerst feine Furchen und Risse im Zahnschmelz sowie der Zahnfleischrand besiedelt werden (BJÖRN und CARLSSON 1964, EGELBERG 1970). Von dort breitet sich die Plaque über die ganze Schmelzoberfläche aus.

In der Anfangsphase dominieren Kolonien grampositiver (Streptokokken, Neisserien) und gramnegativer (Veillonellen) Kokken. Mit fortschreitendem Wachstum besiedeln grampositive Stäbchen (Corynebakterien, Aktinomyzeten) sowie in geringen Mengen Laktobazillen und andere gramnegative Stäbchen zusätzlich die Plaque (EGELBERG 1970, BOSSMANN 1979a). Das Milieu wird dabei besonders in den tiefen Schichten zunehmend anaerob. Häufig kann auch *Candida albicans* nachgewiesen werden. Seine Rolle im Rahmen der Kariogenese ist noch nicht geklärt (BOSSMANN 1979a).

Die tatsächliche Zahl beteiligter Bakterienstämme ist sehr viel größer. Wenn auch viele in der Plaque vorkommende Arten mengenmäßig gering sind, schließt das keineswegs die gegenseitige Beeinflussung aus.

So können Veillonellen nicht allein auf glatten Flächen siedeln (BOSSMANN 1979a). Sie benötigen zu ihrem Wachstum eine anaerobe

Umgebung (MIKX und VAN DER HOEVEN 1975), die erst durch ein vorheriges Wachstum aerober und fakultativ anaerober Mikroorganismen entsteht (RITZ 1967). Das Wachstum der Veillonellen wird wesentlich durch die von den plaquesbildenden Bakterien (v.a. Streptokokken) gebildete Menge an Milchsäure bestimmt (MIKX und VAN DER HOEVEN 1975), da Veillonellen diese Säure bevorzugt als Substrat verwerten (JOHNS 1951).

Streptococcus mutans und *Actinomyces* stören sich in ihrem Stoffwechsel nicht (RAAB 1981); die Umsatzgeschwindigkeit des Glukoseabbaus ist jedoch bei den Streptokokken etwa um den Faktor 3 größer.

2. Stoffwechselvorgänge

In den Zahnbelägen laufen zahlreiche Stoffwechselvorgänge ab, die alle darauf ausgerichtet sind, die Arterhaltung und die Vermehrung der Bakterienpopulation zu gewährleisten. Besondere Beachtung verdient dabei im Rahmen der Kariogenese der Kohlenhydratmetabolismus, der u.a. durch die Bildung organischer Karbonsäuren sowie intra- und extrazellulärer Polysaccharide gekennzeichnet ist.

Bei einem Überangebot von Nahrungszuckern werden diese von vielen Bakterien zu intrazellulären Polysacchariden (IPS) vom Glykogentyp (BRAMSTEDT und LUSTY 1968) synthetisiert und gespeichert. Ihre Bedeutung ist darin zu sehen, daß es sich um Reservekohlenhydrate handelt, die bei einem Zuckerminderangebot rasch wieder gespalten und weiter zu Säuren abgebaut werden können (BOSSMANN 1979a), und die besonders bei kariesanfälligen Personen in großer Zahl in der Plaque vorkommen (GIBBONS und SOCRANSKY 1962). Durch eine ständig hohe Zuckierzufuhr kann die Syntheserate der IPS aber auch bei kariesresistenten Personen gesteigert werden (BRAMSTEDT und TRAUTNER 1971). GEHRING (1969) konnte zeigen, daß nichtkariogene Streptokokkenstämme durch ein dauernd hohes Zuckerangebot zugrunde gehen und daß es damit zu einer Selektion der kariogenen Stämme kommt.

Polysaccharide werden aber auch extrazellulär gespeichert. Diese extrazellulären Polysaccharide (EPS) werden vorzugsweise aus Saccharose gebildet, wobei den aus Glukose synthetisierten Polydextrans eine besondere Funktion im Rahmen des Plaquewachstums zukommt. Sie sind durch ihre klebrige Konsistenz befähigt, die Bakterienkolonien untereinander zu verbinden (BOSSMANN 1979a) und damit die von BLACK (1898) beschriebenen "gelatineous microbic plaques" zu bilden. Ihre Synthese durch die Plaquebakterien ist nicht notwendig für die bakterielle Besiedlung der Zahnoberfläche, sondern vielmehr verantwortlich für das Dickenwachstum und die Volumenzunahme der Plaque (CRITCHLEY et al. 1968).

Die Bedeutung der Polysaccharidsynthese und -speicherung liegt in der Begünstigung des Plaquewachstums durch Bildung einer organischen Matrix und darin, daß die Zahnoberfläche unabhängig von neuer Nahrungsaufnahme einem ständigen Säureangriff ausgesetzt ist (RANKE et al. 1967).

Die Spaltung der Nahrungszucker in Monosaccharide und der Abbau zu organischen Säuren ist ein weiteres Charakteristikum der Plaquebakterien. So wurden bisher wenigstens 3 Gruppen Saccharose spaltender Enzyme (Glukosyltransferase, Fructosyltransferase, Invertase) nachgewiesen (BIRKHED 1975).

Anhand des bakteriellen Glukoseumsatzes hat man einen genaueren Einblick in das Stoffwechselgeschehen bekommen. Die meisten Streptokokkenstämme bauen Glukose bevorzugt zu Laktat ausschließlich auf dem Embden-Meyerhof-Weg ab (DALLMEIER 1970). Bei Streptococcus mutans-Kulturen wurden zusätzlich Essigsäure, Ameisensäure und Äthanol als Fermentationsendprodukte bestimmt (DALLMEIER et al. 1970, KLEINBERG 1970, MIKX und VAN DER HOEVEN 1975, DISTLER und KRONCKE 1979). MIKX und VAN DER HOEVEN (1975) konnten bei in vitro Versuchen mit

wachsenden *Streptococcus mutans*-Stämmen zeigen, daß mit steigender Glukosekonzentration im Nährmedium die Menge an Essigsäure zunahm.

Aktinomyzeten bilden im CO_2 -freien Milieu aus Glukose fast nur Laktat. Bei Vorhandensein von CO_2 wird die Laktatproduktion geringer, und es entstehen zusätzlich Succinat, Acetat und Formiat (BUCHANAN und PINE 1963, RAAB 1981). Es fanden sich Hinweise, daß CO_2 entweder über Phosphoenolpyruvat oder Pyruvat in den Stoffwechselweg eingeschleust wurde und Succinat über die Intermediärprodukte Oxalacetat, Malat und Fumarat entstanden sein könnte (BUCHANAN und PINE 1967).

Veillonellen bauen keine Glukose ab (BREDE 1971). Sie verwerten vielmehr das von den Streptokokken und Aktinomyzeten gebildete Laktat zu Essig- und Propionsäure (MIKX und VAN DER HOEVEN 1975, DISTLER et al. 1980). Streptokokken und Veillonellen bilden somit eine Nahrungskette (MIKX und VAN DER HOEVEN 1975).

Es fehlen bisher Hinweise, daß Veillonellen Ameisensäure produzieren. In geringen Mengen wird diese aber von Streptokokken und Aktinomyzeten gebildet. Eine Möglichkeit ihrer Entstehung wäre die Spaltung von Pyruvat in Acetat und Formiat durch eine Pyruvat-Formiat-Lyase (DISTLER et al. 1980).

Die von den Aktinomyzeten gebildete Bernsteinsäure (RAAB 1981) wird im sauren Milieu sehr schnell von Veillonellen in Propionsäure und CO_2 gespalten (DISTLER et al. 1980). Das dürfte einer der Gründe dafür sein, daß Bernsteinsäure bisher bei Plaqueuntersuchungen nicht nachgewiesen werden konnte.

Inkubiert man Plaqueproben in einem glukosehaltigen Milieu, entstehen neben Milch-, Essig- und Propionsäure (GILMOUR und POOLE 1967) in

geringen Mengen Ameisensäure (MUNTZ 1943, DISTLER und KRÖNCKE 1978), Buttersäure (GEDDES und GILMOUR 1969, GEDDES 1972) und Valeriansäure (RANKE et al. 1964). Mit Hilfe uniform markierter Glukose konnte nachgewiesen werden, daß diese Säuren tatsächlich aus Glukose und nicht, wie man bei einigen annehmen könnte, aus Aminosäuren stammen (RANKE et al. 1964).

3. Plaqueuntersuchungen

MILLERs Experimente ahmten nicht die Phase des Kariesinitials nach und erklärten auch nicht, warum der Speichel die entstehenden Säuren nicht abpufferte. STEPHAN griff MILLERs Theorie auf und vermutete, daß es an der Plaque lag, die ein Diffusionshindernis für die innerhalb der Beläge gebildeten Säuren darstellte. Ein Zusammenhang zwischen dem pH-Wert der Säure und der Anlösung des Schmelzes erschien ihm logisch. Als erster führte er daher pH-Messungen mittels einer Antimonelektrode direkt im Munde durch und beschrieb die zeitlichen Veränderungen des pH vor und nach Spülungen mit verschiedenen Kohlenhydratlösungen, wobei Glukose- und Saccharoselösungen die größten pH-Veränderungen ergaben. Bei niedrigeren pH-Werten als pH 5,0 - 5,5 würde seiner Meinung nach der Schmelz in Lösung gehen und damit Karies erzeugt werden (STEPHAN 1940).

Die Methode der pH-Messungen wurde später immer wieder verfeinert, u.a. auch von MÜHLEMANN und Mitarbeitern, die mit einer in künstliche Zähne eingebauten, telemetrisch arbeitenden Mikroelektrode fortlaufende pH-Bestimmungen ohne Eingriff in das Bakterien- und Säuremilieu unternahmen (GRAF und MÜHLEMANN 1966). Gemeinsam aber war allen Bestimmungen, daß der Genuß zuckerhaltiger Nahrungsmittel im allgemeinen innerhalb von 15 min eine pH-Absenkung unter pH 5,0 - 5,5 ergab (STEPHAN 1940, NEFF 1967, DE BOEVER et al. 1969).

EGGERS-LURA behauptete, daß Zucker nur in Konzentrationen größer 20 % kariogen wäre. Bei solchen Zuckerlösungskonzentrationen sollte das pH ansteigen und Apatit durch Komplexbildung in Lösung gehen. Er veröffentlichte eine pH-Kurve mit einem Anstieg von pH 6,2 (Ruhewert) auf pH 7,5 nach dem Essen einer Süßigkeit. Seine Ergebnisse wurden aber eindeutig durch DE BOEVER und Mitarbeiter (1969) widerlegt. Je älter und dicker die Plaqueschicht, desto größer ist die Gefahr der pH-Absenkung nach Spülung mit Zuckerlösungen (DE BOEVER und MOHLE-MANN 1970).

Bereits 1943 identifizierte MUNTZ die durch Stoffwechselleistungen von Bakterien entstehenden Säuren. Plaqueproben wurden bei Versuchen in späteren Jahren aus dem Mund entnommen und die darin enthaltenen Karbonsäuren - teilweise nach Inkubation in vitro mit Zuckerlösungen - sowohl qualitativ als auch quantitativ bestimmt (RANKE et al. 1964, GEDDES und GILMOUR 1969, GEDDES 1972, TYLER 1975, DISTLER und KRONCKE 1978). Bei der Trennung der Säuregemische wurden die verschiedensten Techniken angewendet: Papierchromatographie (RANKE et al. 1964), Gaschromatographie (GEDDES und GILMOUR 1969, GEDDES 1972, TYLER 1975), Isotachophorese (MINAH und LOESCHE 1976, DELLEBARRE et al. 1977), Hochdruckflüssigkeitschromatographie (DISTLER und KRONCKE 1978). Die Laktatkonzentration ermittelte man zum Teil auch colorimetrisch (MOORE et al. 1956) oder enzymatisch (GEDDES 1972).

Die Bestimmung der Säurezusammensetzung von Plaque, die während der Versuchsdauer im Mundmilieu belassen wurde, gelang erst in letzter Zeit (GEDDES 1975, GILMOUR et al. 1979). Zwar hatten MOORE und Mitarbeiter bereits in den fünfziger Jahren ähnliche Versuche durchgeführt, mußten sich jedoch mangels hinreichend genauer und präziser Trennungs- und Nachweismethoden auf die Bestimmung von Laktat

beschränken (MOORE et al. 1956, ENGLANDER et al. 1956). Ihre colorimetrische Methode zur Laktatbestimmung nach BARKER und SUMMERSON lieferte zudem falsch hohe Milchsäurewerte (GEDDES 1975, DISTLER 1981).

Die geringe Menge an Plaque, die man von einem Probanden erhalten kann, hat bis vor kurzem noch dazu geführt, daß von mehreren Probanden gewonnene Plaque im Pool untersucht werden mußte (GEDDES 1975). Dadurch verwischten sich mögliche Unterschiede zwischen den Einzelproben. Die erst in neuerer Zeit entwickelte Isotachophorese zur Trennung von Stoffgemischen erlaubte zwar die Untersuchung der von einzelnen Probanden gewonnenen Plaqueproben, konnte aber nicht das gesamte Säurespektrum erfassen (DELLEBARRE et al. 1977).

III. MATERIAL UND METHODEN

A. Zur methodischen Problematik

Bakterielle Stoffwechselprodukte in Plaques entstehen nur in sehr geringen Mengen (10^{-9} g). Zur qualitativen und besonders zur quantitativen Bestimmung dieser Mengen sind sehr genaue Meßverfahren notwendig, da sonst meßfehlerbedingt erhebliche Schwankungen bei den Ergebnissen auftreten und so einen Vergleich verschiedener Werte erschweren oder gar unmöglich machen.

Zur Bestimmung der Carbonsäuren in dieser Versuchsreihe wurde deshalb die Hochdruckflüssigkeitschromatographie gewählt, da sie folgende Vorteile bietet:

1. Die niederen Säuren liegen als Natriumsalz bzw. als Ester vor und sind daher nicht flüchtig.
2. Quantitative Bestimmungen sind auch noch bei einem Plaquaßgewicht von 5 mg mit hinreichender Genauigkeit möglich.

Ein weiteres Problem dieser Versuchsreihe war, die Stoffwechselvorgänge der Plaquebakterien zum Zeitpunkt der Entnahme aus dem Mund zu stoppen. Aus diesem Grund wurde die Plaque nach der Entnahme möglichst gut gekühlt. Zusätzlich könnte das zur Suspension verwendete Aqua bidest. den Stoffwechsel der Bakterien durch osmotische Vorgänge gestört haben.

B. Versuchsvorbereitung

Die untersuchten Plaqueproben stammten zum Teil von Patienten der Klinik und Poliklinik für Kieferchirurgie der Universität Erlangen-Nürnberg, zum Teil von Probanden, die sich freiwillig zur Verfügung gestellt hatten.

Vor Beginn des Versuchs wurden die Probanden angewiesen, eine gründliche Zahnreinigung mit Bürste und Zahnpasta vorzunehmen. Das Ergebnis wurde kontrolliert, und es wurde, wenn nötig, mit geeigneten zahnärztlichen Instrumenten nachgereinigt. Die Probanden enthielten sich daraufhin für die Dauer des Versuchs (1 - 7 Tage) jeglicher Zahnpflege wie auch des Spülens mit Mundwasser.

C. Plaqueentnahme

Die Plaquegewinnung erfolgte circa 3 h nach Einnahme der letzten Mahlzeit. Die Probanden wurden angewiesen, den Mund gründlich mit Wasser zu spülen, um die Reinigung von Speichel und Nahrungspartikeln zu gewährleisten (KRASSE 1954). Bei Benutzung eines Wassersprays wurde ein Teil der vorhandenen Plaque weggesprüht, wie in Vorversuchen gezeigt worden ist.

Anschließend wurden Watterollen gelegt und die Zahnoberflächen mit Warmluft getrocknet, um eine Verunreinigung der Plaqueproben durch Speichel zu verhindern. Die Entnahme selbst erfolgte mit sterilen Schabern oder Curetten wahllos aus allen vier Quadranten des Gebisses, wobei die Kontamination mit Blut, Speichel, Zahnstein und Speiseresten sorgfältig vermieden wurde, um dadurch mögliche Fehlerquellen auszuschließen.

Unmittelbar darauf wurde jede Probe mittels eines weiteren sterilen Instrumentes in ein vorher gewogenes Einmalzentrifugengläschen, das mit 1 ml gekühltem (0° C) Aqua bidest. gefüllt war, übergeführt, um die weitere Stoffwechselaktivität der Plaquebakterien auf ein Minimum zu reduzieren. Physiologische Kochsalzlösung hatte sich dafür als weniger geeignet erwiesen, da bei der späteren chromatographischen Trennung der entstandenen Säuren störende Reaktionsprodukte des NaCl auftraten.

D. Zuckerspülversuche

Daraufhin erhielten die Probanden eine 20 %ige Lösung von Haushaltszucker in Aqua bidest., um damit fünf Minuten lang den Mund zu spülen. Um der Verdünnung durch Speichel entgegenzuwirken, wurde die Spüllösung im Mund jede Minute erneuert. Die Plaqueentnahme erfolgte dann, wie unter C. beschrieben, jeweils 8 - 9 min, 12 - 13 min, 15 - 16 min und 18 - 19 min nach Beginn des Zuckerspülens.

E. Weiterverarbeitung der Plaqueproben

Das Gewicht der gekühlten Plaqueproben wurde unmittelbar nach Beendigung der Entnahme durch Wiegen ermittelt (Waage Sartorius Typ 2474). Die Proben wurden je zweimal 10 s mit Ultraschall behandelt (Braun sonic 300 S, 300 W, Energie 20 %, Nadelsonde 4 mm) und anschließend zentrifugiert (Heraeus-Christ Minifuge Typ 3908, 3000 Upm, 10 min, -1°C). Die Überstände wurden nach Proben getrennt in mit Eiswasser gekühlte Glasrundkolben übergeführt, das Sediment mit einem weiteren ml Aqua bidest. gelöst, ultraschallbehandelt, zentrifugiert, und die Überstände ebenfalls in die Rundkolben gefüllt. Das zweimalige Suspendieren war nötig, da sich bei Vorversuchen gezeigt hatte, daß im zweiten Überstand noch gewisse Säuremengen, im dritten jedoch nur noch Spuren davon vorhanden waren. Abschließend erfolgte die Überführung der gelösten Säuren in ihre Na-Salze durch 0,05 n NaOH (Indikator 1 - 2 Tropfen 1 % Phenolphthaleinlösung) und das Tiefgefrieren bei -18°C .

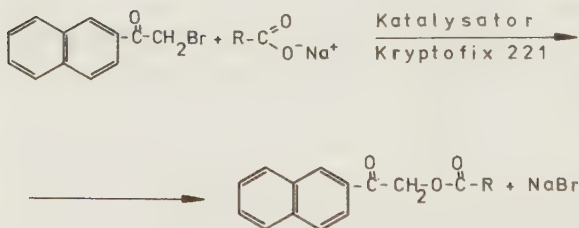
F. Überführung der Na-Salze in die Naphtacyl ester

Die gefrorene wäßrige Lösung der Na-Salze der zu untersuchenden Karbonsäuren wurde zunächst an einer Ölvakuumpumpe bei Raumtemperatur gefrieretrocknet.

Bei den weiteren Verarbeitungsschritten ist auf strenge Wasserfreiheit zu achten:

1. Lösen der getrockneten Na-Salze in 5 ml wasserfreiem Acetonitril (Fa. Merck, Darmstadt) und 0,5 ml Dimethylformamid (Fa. Merck, Darmstadt).
2. Pro 15 mg Plaquenaßgewicht werden 0,8 µmol einer Lösung von Naphtacylbromid (99 % rein, Fa. Aldrich, Brüssel) in Acetonitril zugegeben (25 mg auf 10 ml, 1 : 10 verdünnt).
3. Unter Wasserausschluß (CaCl₂-Rohr) und mit Rückflußkühlung wird 1,5 h im Ultraschallbad homogenisiert.
4. Zugabe von 20 µl Kryptofix 221 (4,7,13,16,21-penta oxa-1,10-diazabicyclo-(8,8,5)-tricosan; 0,2 mol; Fa. Merck, Darmstadt), gelöst in wasserfreiem Acetonitril, unter N₂-Begasung.
5. 2,5 h kochen im Ölbad mit Rückflußkühler unter Wasserausschluß.

Dabei läuft folgende Veresterungsreaktion ab (DISTLER 1980):



6. Abfiltrieren des entstandenen NaBr.

7. Das Lösungsmittel wird bei ca. 60 - 70° C unter Verwendung eines Rotationsverdampfers im Wasserstrahlvakuum eingedampft.

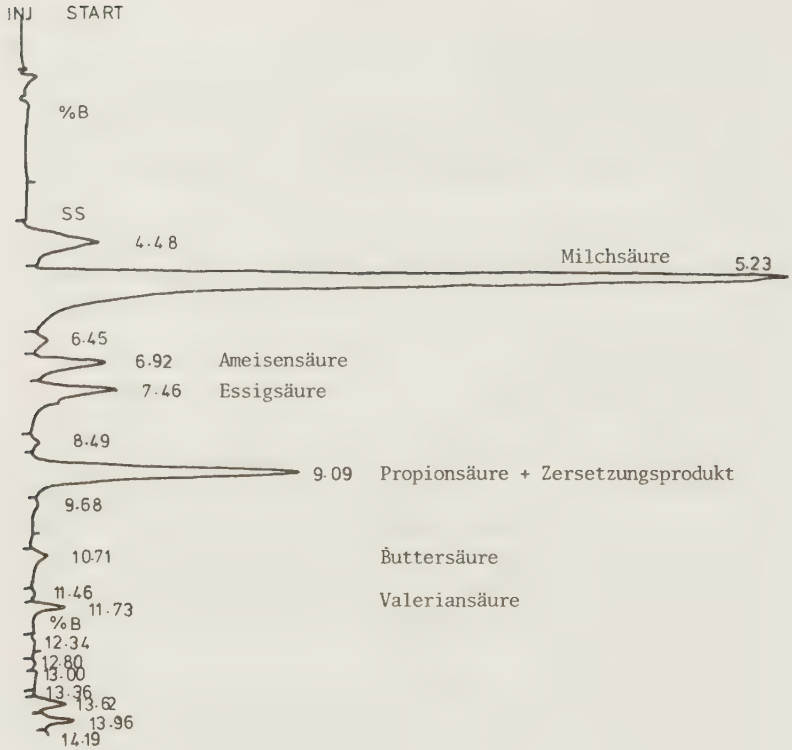
8. Der verbleibende Rückstand wird mit 500 µl wasserfreiem Acetonitril gelöst.

Jeweils 10 µl der gewonnenen Lösung wurden nun chromatographisch untersucht.

G. Chromatographische Trennung

Sie erfolgte mittels eines Hochdruckflüssigkeitschromatographen (Hewlett-Packard 1084 A) mit einem Zweistrahlsspektrometer im UV-Bereich (Hewlett-Packard 1030 B) als Detektor (Meßwellenlänge $\lambda = 246 \text{ nm}$). Als Trennsäule diente eine Fertigsäule Merck Li Chro Sorb RP 8 (250 mm, innerer Durchmesser 4 mm, Porengröße 7 µm). Die Trennung erfolgte mit einem Wasser-Acetonitrilgemisch bei einem Druck von 242 bar.

Der Ausdruck in der Spalte AMT erfolgte in ng Naphtacyl ester der jeweiligen Säure. Geeicht wurde der Chromatograph mit 10 µl eines Gemisches aus je 500 ng Naphtacyl ester von Milch-, Ameisen-, Essig-, Propion-, Butter- und Valeriansäure sowie 50 ng Ester der Bernsteinsäure. Dabei zeigte sich, daß Peak 4 (siehe Abb. 2) ein Gemisch aus Propionsäurenaphtacyl ester und einem Nebenprodukt (Naphtacylchlorid) darstellt (DISTLER 1980).



hp 1080A

ESTD RT	EXP RT	AREA		CAL#	AMT
5.23	5.33	658000	R	1	2490.54
6.92	6.88	47730		2	159.526
7.46	7.40	64680		3	203.013
9.09	9.08	165500		4	556.864
10.71	10.63	7430		5	24.652
11.73	12.00	14550		6	56.091

XF: 1.0000 E+ 0

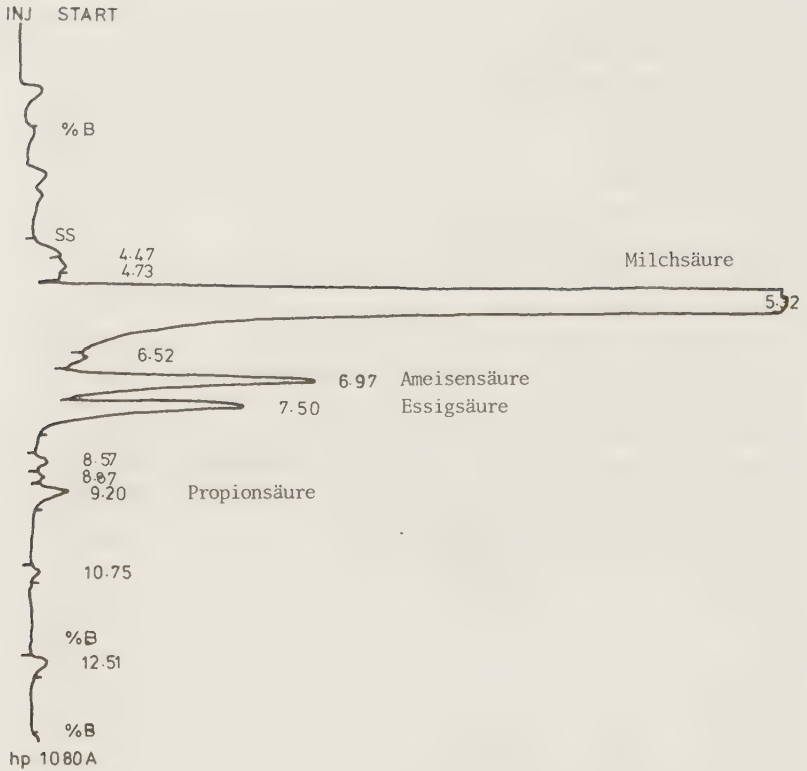
Column P 167

% B
STOP

Abb. 2: Charakteristisches Diagramm des Hochdruckflüssigkeitschromatographen mit angeschlossenem UV-Detektor

Da aber Propionsäure in den Plaqueproben in nicht unerheblichen Konzentrationen vermutet wurde, erfolgte eine zusätzliche chromatographische Trennung von weiteren 10 μ l Probengemisch mit einem angeschlossenen Fluoreszenzdetektor (Kontron Spectrofluorometer SFM 23; Emission λ = 450 nm, Excitation λ = 290 nm). Bei der verwendeten Wellenlänge weist das Nebenprodukt wie auch das reine Naphtacylbromid keine Fluoreszenz auf. Die Größe des Peaks 4 entspricht hier der tatsächlichen Menge an Propionsäurenaphhtacylester (Abb. 3).

Zur Auswertung ist trotzdem das Diagramm des UV-Detektors herangezogen worden, da er die größere Empfindlichkeit besitzt. Lediglich der Wert für die Propionsäure wurde durch Vergleich der Säurewerte von UV- und Fluoreszenzdiagramm ermittelt. Die mit dem UV-Detektor gewonnenen Säurewerte lagen alle um einen innerhalb der Meßgenauigkeit konstanten Faktor (im Mittel 1,15) höher als die mit dem Fluoreszenzdetektor erhaltenen. Um den für den UV-Detektor entsprechenden Propionsäurewert zu errechnen, wurde der Propionsäurewert des Fluoreszenzdetektors mit obigem Faktor multipliziert.



ESTD RT	EXP RT	AREA	CAL#	AMT
5.32	5.41	925200	1	2153.63
6.97	6.97	44430	2	138.325
7.50	7.49	32070	3	132.302
9.20	9.16	3998	4	32.835

XF: 1.0000 E+ 0

% B STOP

Abb. 3: Charakteristisches Diagramm des Hochdruckflüssigkeitschromatographen mit angeschlossenem Fluoreszenzdetektor

IV. ERGEBNISSE

A. Naßgewicht der Plaque; Plaquealter; Kariesaktivität

Es wurden von den Probanden alle erreichbaren Plaques abgenommen, je Probe aber möglichst nicht weniger als 10 mg, um durch die Chromatographiemethode bedingte Fehler in Grenzen zu halten. Die durchschnittliche Fehlerabweichung beträgt bei der gewählten Hochdruckflüssigkeitschromatographie durchschnittlich ± 5 ng (Ermittlung durch Eichgemische).

Bedingt durch die unterschiedliche Plaquegesamtmenge einerseits und die erforderliche Mindestmenge andererseits ergab sich von Proband zu Proband eine andere Probenzahl. Nicht bei jedem Probanden war die Plaquemenge ausreichend für die vorgesehenen fünf Entnahmen. Bei einigen Probanden konnten jedoch auch mehr Proben (bis zu sieben) gewonnen werden.

Die Plaquegesamtmenge je Proband schwankte von 23 bis 177 mg Naßgewicht und betrug im Durchschnitt 80 mg (Tab. 1).

Proband	Plaquesgesamtmenge [mg]	Probenzahl	Durchschnitt pro Probe[mg]	Plaquealter	Karies
17	177	5	23,5	5-6	-
20	23	3	7,2	7	+/-
22	57	4	14,3	4	-
30	50	4	12,5	7	+
32	49	4	12,3	3	+
33	43	4	10,9	6	+
34	177	7	25,4	7	+
36	129	6	21,5	7	+

Durchschnittliche Plaquemenge: 80 mg Naßgewicht

Erläuterungen:

Karies - : kariesfreies Gebiß (intakte Zähne bzw. Füllungen)

Karies +/-: versorgtes Gebiß mit geringer Sekundärkaries

Karies + : unversorgtes, kariöses Gebiß

Tabelle 1: Plaquemengen und Probenzahl

Aus den hier vorliegenden Ergebnissen war es nicht möglich, einen Zusammenhang von Plaquemenge und Plaquealter bzw. von Plaquemenge und dem Vorhandensein von kariösen Läsionen zu erkennen.

B. Berechnungsmethode

Von jeder auf den Chromatogrammen ausgedruckten Säuremenge (Milch-, Ameisen-, Essig-, Propion-, Butter-, Valerian- und Bernsteinsäure) wurden getrennt für jede Entnahmezeit (0, 8/9, 12/13, 15/16 und 17/18 min) sowohl die Menge in nmol bezogen auf 1 mg Naßgewicht Plaque als auch die prozentuelle molare Verteilung der Säuren errechnet. Zusätzlich wurde die Gesamtsäuremenge je Probe in nmol/mg Naßgewicht bestimmt.

C. Ruheplaque

Unter Ruheplaque sei hier die Plaque zu verstehen, die vor der Zuckerspülung (also zur Zeit 0 min) abgenommen wurde.

Milch-, Ameisen-, Essig-, Propion- und Buttersäure konnten in allen Proben nachgewiesen werden, Propion- und Buttersäure in einigen Proben allerdings nur in Spuren, so daß bei diesen Proben eine quantitative Auswertung unterlassen wurde (Tab. 2).

Valerian- und Bernsteinsäure waren allenfalls in Spuren nachzuweisen ($< 2 \text{ Mol\%}$). Die ausgedruckten Peaks auf den Chromatogrammen waren kaum höher als das Grundlinienrauschen, so daß eine quantitative Auswertung wenig sinnvoll erschien.

	Mittelwert [nmol/mg NG]	Bereich [nmol/mg NG]	Mittelwert [Mol%]	Bereich [Mol%]
Milchsäure	3,3	1,1 - 6,0	30,8	19,7 - 44,9
Ameisensäure	1,2	0,7 - 2,4	14,8	3,3 - 27,0
Essigsäure	4,3	0,5 - 11,4	32,0	10,1 - 47,6
Propionsäure	2,2	0,0 - 7,1	13,0	0,0 - 25,9
Buttersäure	1,1	0,0 - 2,0	9,4	0,0 - 21,3
Gesamtsäure- menge	12,0	4,0 - 27,4		

Tabelle 2: Säuremengen in der Ruheplaque

In den Fällen, in denen weniger Milchsäure vorhanden ist als Essigsäure, beträgt der Milchsäurewert ungefähr die Hälfte des Essigsäurewertes. Bei der Gegengruppe (Milchsäure > Essigsäure) ist ein konstantes Verhältnis nicht festzustellen, ebensowenig wie bei den anderen untersuchten Säuren.

Bei der Hälfte der Proben beträgt der Milchsäureanteil durchschnittlich 36 %, der Essigsäureanteil hingegen ≈ 19 %. Bei der anderen Hälfte ist das Verhältnis umgekehrt: Milchsäure ≈ 23 %, Essigsäure ≈ 44 %. Bei Ameisen- und Propionsäure ist es ähnlich: Ameisensäure ≈ 24 %, Propionsäure ≈ 3 %, bzw. Ameisensäure ≈ 8 %, Propionsäure ≈ 23 %, jeweils bei der Hälfte der Proben. Bei den anderen Säuren sind derartige Relationen nicht zu bestimmen.

Es scheint, als ob sich zwei Gruppen mit je zwei Wertepaaren angeben lassen, wobei die Wertepaare aus Gruppe 1 frei mit denen aus Gruppe 2 kombiniert werden können.

Gruppe 1	Milchsäure	36	23	Angaben in Mol%
	Essigsäure	19	44	
Gruppe 2	Ameisensäure	24	8	
	Propionsäure	3	23	

Betrachtet man das Verhältnis $\frac{\text{Milchsäure} + \text{Essigsäure}}{\text{Ameisensäure} + \text{Propionsäure}} \frac{\text{nmol/mg NG}}{\text{nmol/mg NG}}$, so ergibt sich ein relativ konstanter Wert von 2,3 ($\sigma = 0,55$) (Abb. 4). Andere Kombinationen der Säuren ergaben keine signifikanten Zusammenhänge.

Ameisensäure + Propionsäure [nmol/mg NG]

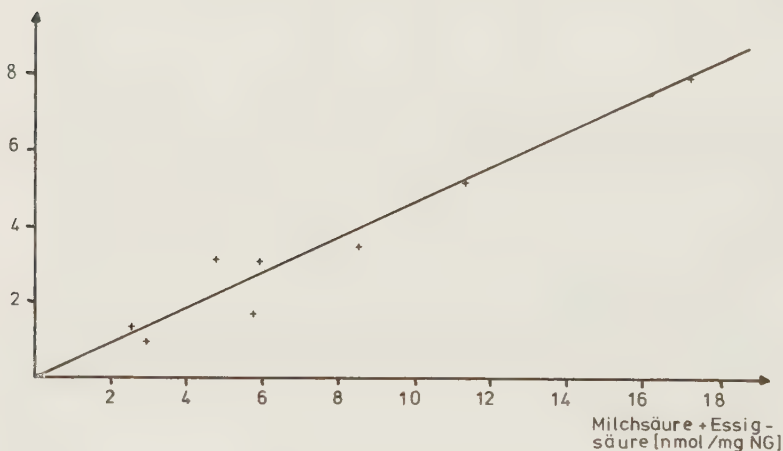


Abb. 4: Beziehung zwischen Milchsäure + Essigsäure und Ameisensäure + Propionsäure

Weder der Milchsäureleerwert noch die Summe der Säureleerwerte zeigen eine Abhängigkeit von der Kariesaktivität bzw. vom Plaquealter, soweit das aufgrund der vorliegenden Ergebnisse beurteilt werden kann.

D. Plaque nach Zuckerspülung

1. Allgemeines

Eine für alle untersuchten Plaqueproben gültige Angabe über die Zeitabhängigkeit der Säurekonzentrationen nach Zuckerspülungen kann nicht gemacht werden. Die einzelnen Säurekonzentrationen unterliegen zum Teil erheblichen Schwankungen. Gleichwohl sind Gemeinsamkeiten der Plaqueproben untereinander nach der Zuckerspülung zu erkennen.

Bei der Beschreibung der Ergebnisse können weniger quantitative als vielmehr qualitative Aussagen über die Änderungen der Säurezusammensetzung in Plaqueproben gemacht werden.

Milch-, Ameisen-, Essig-, Propion- und Buttersäure waren in allen Proben nach Zuckerspülung quantifizierbar, Buttersäure häufig nur in sehr geringen Konzentrationen. Valerian- und Bernsteinsäure konnten nicht in allen Proben als gesichert nachgewiesen werden.

2. Verhalten der absoluten Säuremengen

Die Milchsäure ist nach der Zuckerspülung die beherrschende Säure. Auch wenn vorher die Essigsäure in der Konzentration höher lag, ist zur Zeit 8/9 min der Milchsäurewert in jedem Fall größer. Er erreicht in den maximal gemessenen Konzentrationen ungefähr 50 nmol/mg NG, während bei den anderen Säuren die Maximalkonzentrationen weit darunter liegen (Tab. 3).

	maximale Konzentration [nmol/mg NG]	erreicht bei [min]
Milchsäure	51,5	8/9
Ameisensäure	20,2	8/9
Essigsäure	13,2	12/13
Propionsäure	7,6	12/13
Buttersäure	2,9	8/9

Tabelle 3: maximale Säurekonzentrationen nach Zuckerspülung

Die Tatsache, daß die maximalen Säurekonzentrationen zwischen 8 und 13 min nach Beginn der Zuckerspülung erreicht werden, steht im Einklang mit dem berichteten pH-Minimum in den Plaques etwa im gleichen Zeitraum (GEDDES 1975, BIRKHED et al. 1978).

In den ersten 8 - 9 min besteht bei fast allen Probanden die wesentlichste Änderung gegenüber der Ruheplaque in einem steilen Anstieg der Milchsäurekonzentration, während sich die restlichen Säuren in ihren Mengen relativ wenig ändern. Lediglich bei einem Probanden steigen während der ersten 8 - 9 min alle Säuren um das 16 bis 26fache.

Erst dann erfolgt ein Anstieg bzw. ein Abfall der Mengen der anderen Säuren, wobei allerdings eine Gesetzmäßigkeit nicht zu erkennen ist. Große Änderungen finden mit wenigen Ausnahmen nicht statt.

	Konzentrationsschwankungen nach der Zuckerspülung [nmol/mg NG]
Milchsäure	+ 23,0
Ameisensäure	+ 2,2
Essigsäure	+ 6,5
Propionsäure	+ 3,8
Buttersäure	+ 1,4

Tabelle 4: Konzentrationsschwankungen nach Zuckerspülung

Einzig bei der Milchsäure gibt es eine gewisse Häufigkeit im Verlauf. Sie steigt in fast allen Fällen bis 8/9 min sehr stark an, fällt dann wieder etwas bis ca. 13/14 min, um dann bis ca. 17 min wieder zu steigen. Bei einigen Proben wurde daraufhin ein erneuter Abfall beobachtet. Die Gesamtsäuremenge folgt im wesentlichen der Milchsäuremenge (Abb. 5).

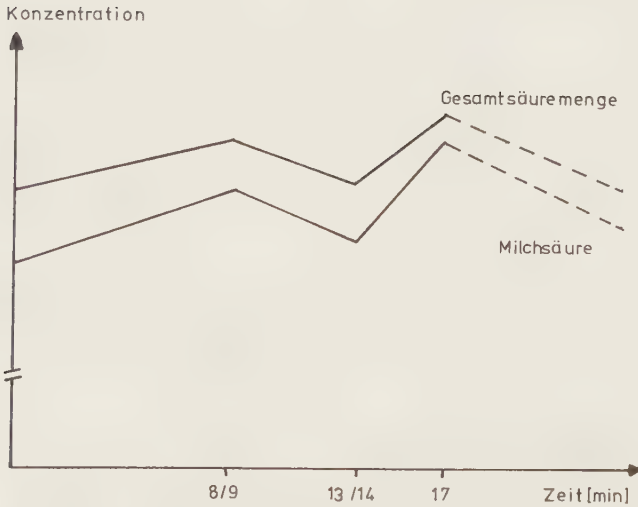


Abb. 5: Milchsäure und Gesamtsäuremenge vor und nach Zuckerspülung

Unterscheidet man kariesaktive (kein oder geringer Kariesbefall) und kariesinaktive (starker oder sehr starker Kariesbefall) Probanden, so ergibt sich folgendes Bild: Bei einem kariesaktiven Probanden steigt die Milchsäure um ca. das 13fache (bei einem Probanden wurde sogar ein Anstieg um das 26fache gemessen), bei den kariesinaktiven ist nur ein Anstieg um das 4 bis 5fache zu verzeichnen. Für die gesamte Säuremenge gilt ähnliches (Tab. 5).

	Faktor des Milchsäureanstiegs Ges.-Säureanstiegs	
Kariesaktive	13 (max. 26)	4 - 6 (max. 19)
Kariesinaktive	4 - 5	2

Tabelle 5: Säureanstieg bei Kariesaktiven und -inaktiven

Aus den maximal erreichten Konzentrationen allein läßt sich jedoch keine Unterscheidungsmöglichkeit zwischen Kariesaktiven und -inaktiven ableiten (Abb. 6 und Abb. 7).

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse könnte man vermuten, daß die Milchsäure bei kariesinaktiven Probanden nicht so hohe Anteile an der Gesamtsäure erreicht wie bei kariesaktiven.

3. Verhalten der relativen Säuremengen

In den ersten 8/9 min nach Beginn der Spülung ist bei fast allen Proben ein Anstieg der Milchsäurekonzentration festzustellen. Die anderen Säuren fallen während dieses Zeitraumes ab bzw. ändern ihre Konzentration wenig. Ab diesem Zeitpunkt können für Ameisen-, Propion- und Buttersäure keine Gemeinsamkeiten mehr festgestellt werden.

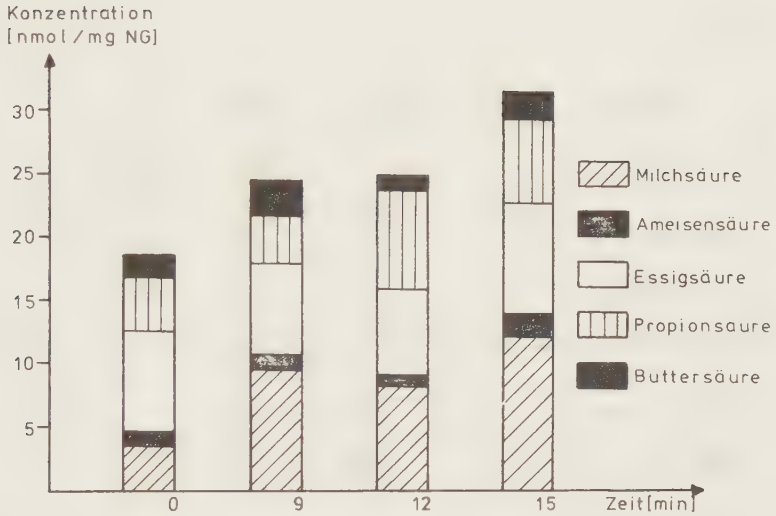


Abb. 6: Säurezusammensetzung vor und nach Zuckerspülung bei einem Kariesinaktiven

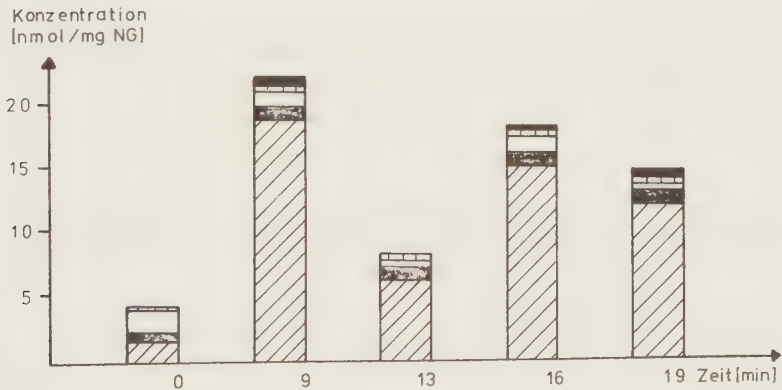


Abb. 7: Säurezusammensetzung vor und nach Zuckerspülung bei einem Kariesaktiven

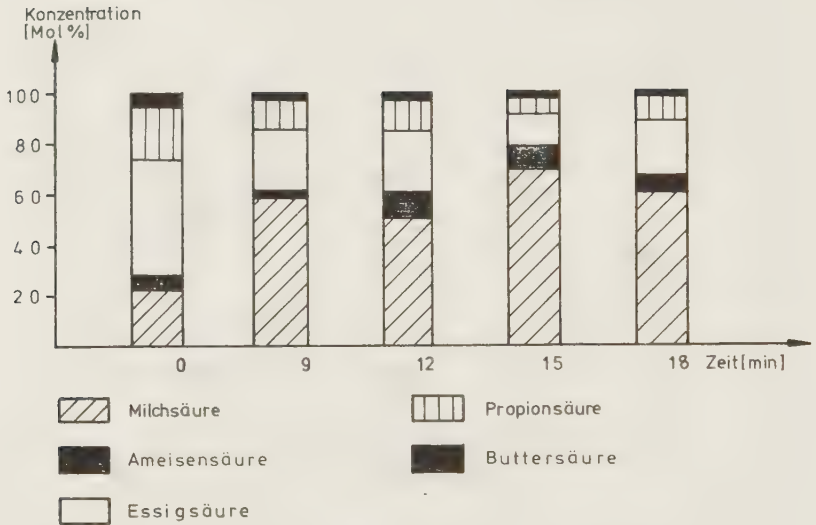


Abb. 8: Charakteristische Säurezusammensetzung vor und nach Zuckerspülung

Für die Milch- und die Essigsäure ist ein in etwa einheitlicher Verlauf erkennbar. Die Milchsäure steigt in 75 % der Fälle bis ca 8/9 min auf ungefähr das 2,5fache ihres Ausgangswertes, erreicht dort ein relatives Maximum und fällt wieder bis ca. 12/13 min, um dann wieder anzusteigen (Abb. 9).

Nach 16 min scheint die Konzentration der Milchsäure erneut zu fallen, was anhand von drei Proben, bei denen länger als 17 min gemessen worden ist, vermutet wird.

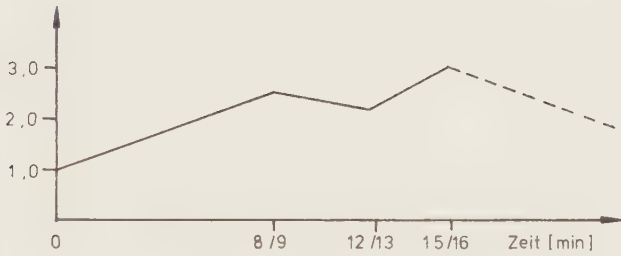


Abb. 9: Kurvenverlauf der Milchsäurekonzentration vor und nach Zuckerspülung

Die Essigsäure zeigt in etwa das umgekehrte Verhalten, d.h. während Zeiten, in denen die Milchsäure steigt, fällt die Essigsäure und umgekehrt (Abb. 10).

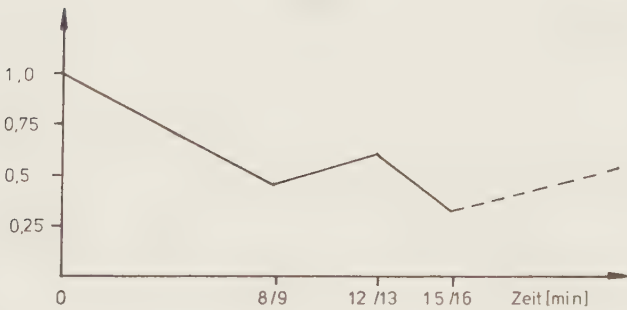


Abb. 10: Kurvenverlauf der Essigsäurekonzentration vor und nach Zuckerspülung

Bei einem Probanden waren die Kurven für Milch- und Essigsäurekonzentration vertauscht und viel flacher (Abb. 11).

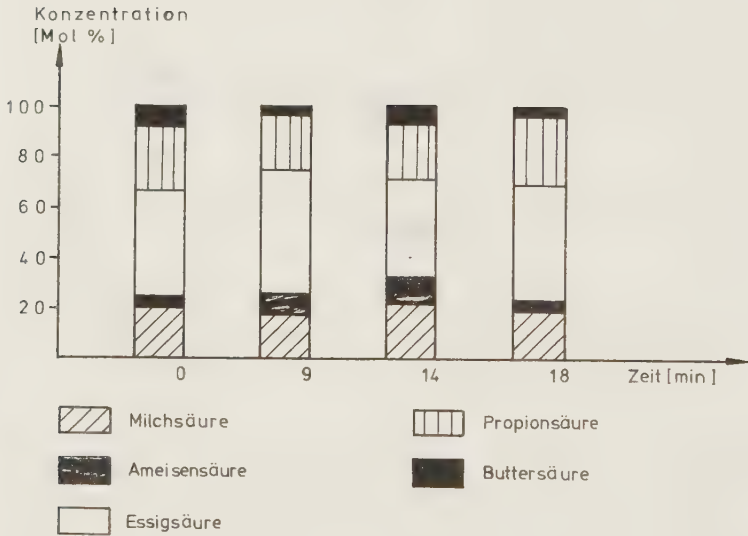


Abb. 11: Säurezusammensetzung vor und nach Zuckerspülung bei Proband 33

V. DISKUSSION

Wie die Ergebnisse dieser in vivo Untersuchung zeigen, werden neben Milch-, Essig-, Propion- und Buttersäure auch Ameisen-, Valerian- und Bernsteinsäure gefunden. Die ersten vier genannten Säuren wurden von allen Autoren, die Säuren aus Plaques extrahierten, nachgewiesen (RANKE et al. 1964, GILMOUR und POOLE 1967, GEDDES 1972, GEDDES 1975, DISTLER und KRÖNCKE 1978, DISTLER und KRÖNCKE 1979, GILMOUR et al. 1979).

Anders sieht es mit Ameisensäure aus. Wegen der Flüchtigkeit der undissoziierten Säure (besonders im sauren Milieu) hängt die Extraktion und mengenmäßige Bestimmung von der gewählten Methode ab. So ist sie auch heute noch nicht bei Trennungsverfahren wie der Gaschromatographie (GLC) bestimmbar (GEDDES 1972, GEDDES 1975), da die meist verwendeten Flammenionisationsdetektoren unempfindlich für diese Säure sind. Weicht man jedoch auf die Salze oder die Ester aus, läßt sie sich relativ leicht quantitativ erfassen (DISTLER und KRÖNCKE 1978).

Angaben über das Vorkommen von Ameisensäure finden sich bei MUNTZ (1943), RANKE et al. (1964) und TYLER (1975). In Arbeiten neueren Datums (GILMOUR et al. 1979) wird ihre Menge bei Ruheplaques mit durchschnittlich 11 - 12 % angegeben, ein Wert, der mit dem hier gefundenen (14,8 %) in etwa übereinstimmt.

Valerian- und Bernsteinsäure wurden in maximalen Konzentrationen < 1 nmol/mg Naßgewicht (auch nach der Zuckerspülung) in der Plaque bestimmt. Valeriansäure wurde bis jetzt von den meisten Autoren überhaupt nicht oder nur in Spuren (RANKE et al. 1964) gefunden. Ein Hinweis auf Bernsteinsäure findet sich bis jetzt nur bei in vitro Versuchen (WYNN et al. 1960, DISTLER et al. 1980, RAAB 1981). Eine Ursache für die geringen Bernsteinsäuremengen könnte in der schnellen Umsetzung zu Propionsäure und CO_2 liegen (KLEINBERG 1970, DISTLER et al. 1980).

Die Säurewerte der Einzelproben zeigen nicht die Einheitlichkeit, wie sie bis jetzt für gepoolte Plaques gefunden wurden (RANKE et al. 1964, TYLER 1972, GEDDES 1975). Zwischen den einzelnen Probanden bestehen durchwegs größere mengenmäßige Schwankungen. Eine bessere Übereinstimmung mit den Werten anderer Autoren erzielt man, wenn man die Werte der verschiedenen Proben mittelt ("rechnerisches Poolen").

Verschiedene Parameter der Plaquebildung waren bei diesem Versuch nicht zu berücksichtigen. Um ein ungestörtes Plaquewachstum zu ermöglichen, sollten die Probanden eine gewisse Zeit auf jegliche Zahnpflege verzichten, jedoch war es nicht möglich, die Art und Menge der Nahrung (weiche/abrasive Kost) sowie Gewohnheiten (Rauchen, Alkohol) zu standardisieren.

Auch die Forderung einer dreistündigen Nahrungskarenz vor der Plaqueentnahme konnte nicht objektiv überprüft werden. Hier war man auf die Angaben der Probanden angewiesen. Bereits geringe Nahrungsmengen (Bonbon, Kaugumme, o.ä.), die ein Proband kurz vor der Plaqueentnahme zu sich genommen hätte, würden die Milchsäure ansteigen lassen und könnten so die zum Teil hohen Milchsäureleerwerte erklären helfen.

Bei den Proben, bei denen die Essigsäure mengenmäßig größer ist als die Milchsäure, findet sich ein relativ konstantes Milch-Essigsäure-Verhältnis (1 : 2). Das mag den Schluß nahelegen, daß durch die Plaquebakterien, die über längere Zeit von jeder Substratzufuhr abgeschnitten waren, und durch das übrige Mundmilieu (Speichel, etc.) ein Gleichgewichtszustand geschaffen wurde.

Die Zeitdauer von der letzten Nahrungsaufnahme (= Substratzufuhr für Bakterien) bis zum Wiedererreichen des jeweiligen Ausgangsniveaus dürfte von Proband zu Proband unterschiedlich sein und von mehreren Faktoren abhängen (Speichelflußrate; Speichelpufferkapazität; Menge der durch Bakterien gebildeten, als Substratreserve dienende, IPS und EPS; Zusammensetzung der Bakterienpopulation; etc.).

Es könnte natürlich auch sein, daß das Milchsäure-Essigsäure-Verhältnis von 0,5 keinen endgültigen Zustand darstellt, sondern nur eine "Momentaufnahme" eines - allerdings immer langsamer ablaufenden - Prozesses der Umwandlung von Milchsäure in andere Abbauprodukte, wie es bei in vitro Versuchen ermittelt wurde (DISTLER und KRÖNCKE 1978, DISTLER et al. 1980).

Bei dem Probanden, der mit Sicherheit vor der Abnahme der Plaqueproben mehr als zwölf Stunden nichts zu sich genommen hatte, war tatsächlich das geringste Milchsäure-Essigsäure-Verhältnis (0,45) und auch der geringste Milchsäureleerwert (19,7 Mol%) zu verzeichnen.

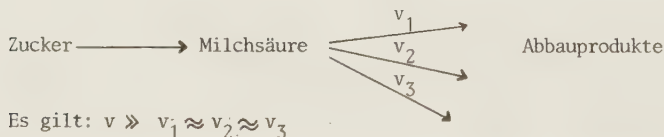
Trotz der unterschiedlichen Milchsäure/Essigsäure-Quotienten war das Mengenverhältnis Milchsäure + Essigsäure (nmol/mg NG) : Ameisensäure + Propionsäure (nmol/mg NG) mit $2,3 \pm 0,55$ bei allen Proben relativ konstant. Dieses Phänomen kann bis jetzt nicht erklärt werden.

Daß Milchsäure nach Zuckerspülung in überwiegend sehr hohen Konzentrationen gefunden wurde, ist nicht weiter verwunderlich. Seit langem ist bekannt, daß besonders die in großer Zahl vorkommenden Plaquestreptokokken (BOSS-MANN 1979a) Glukose überwiegend zu Milchsäure abbauen. Diese erst wird dann von anderen Bakterien als Substrat verwendet und weiter verstoffwechselt. Aus in vitro Versuchen (BREDE 1971, MIKX und VAN DER HOEVEN 1975, DISTLER et al. 1980) weiß man auch, daß die Weiterverwertung von Milchsäure, z.B. durch Veillonellen, sehr viel langsamer verläuft als ihre Bildung, so daß es zwangsläufig zu einem Anstieg der Milchsäurekonzentration und damit auch zu einem starken pH-Abfall kommen muß, vor allem auch, da die Pufferkapazität der Plaquepuffersysteme weit überschritten wird. Die gebildeten Säuren werden teilweise durch Puffer sowohl im Speichel als auch in der Plaque selbst neutralisiert, wobei die Puffersysteme im Speichel den größeren Teil übernehmen. Die Diffusionsverhältnisse der Plaque gestatten dem Speichel einen relativ ungehinderten Zutritt.

Bikarbonat ist der Hauptpuffer des Speichels, während der Phosphatpuffer ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$) nur eine untergeordnete Rolle spielt. Protein und Kalziumphosphat scheinen die wichtigsten Puffersubstanzen in der Plaque selbst zu sein (KLEINBERG 1970).

Andererseits kann der Speichel die entstehenden Säuremengen nicht schnell genug abtransportieren, was durch die Dicke der Plaqueschichten noch erschwert wird.

Die größte Gesamtsäuremenge ist ebenso wie das pH-Minimum (GEDDES 1975, BIRKHED et al. 1978) zwischen 8 und 13 min zu beobachten. Da aber bis zu diesem Zeitpunkt eigentlich nur die Milchsäure, die ohnehin unter den untersuchten Säuren die stärkste ist ($\text{pK}_s = 3,85$), in ihrer Konzentration zunimmt, müßte eigentlich diese für den größten Teil des initialen pH-Abfalls verantwortlich sein. Die Konzentrationen der anderen Säuren ändern sich entgegen anderen Untersuchungen (GEDDES 1975) nach Zuckerspülung verhältnismäßig wenig. Es wäre daher denkbar, daß die Stoffumsatzgeschwindigkeiten der Laktat verwertenden Bakterien viel geringer sind als die der Milchsäurebildner, und obendrein die weiterführenden Reaktionen untereinander ähnliche Stoffumsatzgeschwindigkeiten (v) besitzen.



Aus den oben angeführten Gründen folgt die Gesamtsäuremenge der Milchsäuremenge.

Wie auch von anderen Autoren (GEDDES 1975) festgestellt wurde, verdoppelte sich die Säuremenge bei Kariesinaktiven nach der Zuckerspülung, während

sie bei Kariesaktiven um einen weit größeren Wert stieg. Allerdings ist der Anstieg größtenteils auf einen Anstieg der Milchsäurekonzentration zurückzuführen.

Verschiedene Ursachen kommen dafür in Betracht:

1. Die Bakterienpopulation bei Kariesaktiven ist in der Lage, in kürzerer Zeit und in größeren Mengen saure Metabolite zu bilden. Aufgrund schlechter Mundhygiene und/oder kariogener Ernährungsweise hätte sich demnach bei den Kariesaktiven eine veränderte Bakterienflora gebildet (selektives Wachstum).
2. Kariesaktive und -inaktive könnten eine unterschiedliche Speichelflußrate besitzen und damit unterschiedlich befähigt sein, die entstehenden Säuren abzupuffern bzw. aus der Plaque abzutransportieren (KLEINBERG 1970).
3. Kariesinaktive könnten gegenüber den -aktiven ein weniger effizientes Enzymsystem mit einem eventuellen Mangel an Coenzymen besitzen (ENGLANDER et al. 1956).

Trotz mancher Gemeinsamkeiten der Kurven untereinander darf nichts darüber hinwegtäuschen, daß zwischen den einzelnen Probanden beträchtliche Unterschiede bestehen. Jedes Individuum besitzt aufgrund seiner Lebens- und Ernährungsweise eine Bakterienpopulation in der Mundhöhle, die sich von anderen sowohl in der Menge als auch in der Zusammensetzung unterscheidet. Auch ist nicht gesagt, daß bei der Entnahme der Plaque, trotz des Versuchs, die Proben gleichmäßig über die Mundhöhle verteilt abzuschaben, eine statistische Bakterienverteilung erreicht worden ist.

Es mag wohl Gemeinsamkeiten in den mikrobiellen Stoffwechselwegen geben, aber die Aufklärung dieser Beziehungen steht erst am Anfang. So ist auch heute noch nichts bzw. sehr wenig über die Abbauege der meisten in den Plaques vorkommenden Bakterien sowie ihrer Wechselwirkungen untereinander bekannt. Bei allen diesen anstehenden Untersuchungen sollte man allerdings nie das Ziel außer acht lassen, die Erforschung der Ursachen und Mechanismen der Kariesentstehung.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Säurezusammensetzung von in vivo gewonnener Plaque vor und nach Spülung mit einer 20 %igen Zuckerlösung wurde untersucht. Die Proben stammten zum Teil von Patienten der Klinik und Poliklinik für Kieferchirurgie der Universität Erlangen-Nürnberg, zum Teil von Probanden, die sich freiwillig zur Verfügung gestellt hatten.

Nach dem Wiegen wurden die enthaltenen Säuremengen quantitativ durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie bestimmt. Milch-, Ameisen-, Essig-, Propion- und Buttersäure waren in allen Proben nachzuweisen, Valerian- und Bernsteinsäure nur in einigen und auch hier nur in Spuren. Die Gesamtsäuremenge in der Plaque, die ungefähr drei Stunden nach der letzten Mahlzeit gewonnen wurde, betrug im Mittel 12 nmol/mg Naßgewicht. Es konnten deutlich zwei Gruppen von Ruheplaqueproben unterschieden werden, bei denen Milch- und Essigsäure bzw. Ameisen- und Propionsäure jeweils feste Konzentrationsverhältnisse aufweisen.

Eine für alle untersuchten Plaqueproben gültige Angabe über die Zeitabhängigkeit der Säurekonzentrationen nach Zuckerspülung kann nicht gemacht werden. Die Milchsäure besaß 8 - 9 min nach Beginn der Zuckerspülung in jedem Fall die größte Konzentration. Die Milchsäure und auch die Gesamtsäuremenge steigen bei Kariesaktiven ungefähr dreimal stärker an als bei Kariesinaktiven. Es konnten charakteristische Kurvenverläufe für Milch- und Essigsäure, jedoch nicht für die anderen Säuren ermittelt werden.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- BIBBY, B.G.: Concerning Dental Plaque.
Caries Res. 2, 97 - 103 (1968)
- BIRKHED, D.: Separation of "Sucrases" in Supernatants of Human Dental Plaque Material and Characterisation of the Reaction Products.
Odont. Revy 26, 185 - 192 (1975)
- BIRKHED, D., EDWARDSSON, S., SVENSSON, B., MOSKOVITZ, F. and FROSTELL, G.: Acid Production from Sorbitol in Human Dental Plaque.
Arch. oral Biol. 23, 971 - 975 (1978)
- BJÖRN, H. and CARLSSON, J.: Observations on a Dental Plaque Morphogenesis.
Odont. Revy 15, 23 - 28 (1964)
- BOSSMANN, K.: Entwicklung und Anwendung einer Methode zur experimentellen Karieserzeugung in vitro.
Die Quintessenz, Berlin 1977
- BOSSMANN, K.: Bildung, Zusammensetzung und Stoffwechsel der Plaque und ihre ätiologische Bedeutung für die Entstehung von Karies.
Kariesprophylaxe 1, 3 - 14 (1979a)
- BOSSMANN, K.: In vitro-Experimente zur Plaquebildung.
Dtsch. zahnärztl. Z. 34, 437 - 439 (1979b)
- BOEVER, J. DE, HIRZEL, H.C. and MÜHLEMANN, H.R.: The Effect of Concentrated Sucrose Solutions on pH of Interproximal Plaque.
Helv. Odont. Acta 13, 27 - 28 (1969)
- BOEVER J. and MÜHLEMANN, H.R.: Radiotelemetric Determination of Oral Fluoride Clearance after Local Application of Fluoride.
Schweiz. Mschr. Zahnheilk. 80, 225 - 237 (1970)
- BRAMSTEDT, F. and LUSTY, C.J.: The Nature of the Intracellular Polysaccharides Synthesised by Streptococci in the Dental Plaque.
Caries Res. 2, 201 - 213 (1968)
- BRAMSTEDT, F. und TRAUTNER, K.: Zuckeraustauschstoffe und Biochemie der Zahnplaques.
Dtsch. zahnärztl. Z. 26, 1135 - 1144 (1971)
- BREDE, E.: Abbau von Calcium- und Natriumlactat durch Plaqueveillonellen.
Med. Diss., Würzburg 1971

- BUCHANAN, B.B. and PINE, L.: Factors Influencing the Fermentation and Growth of an Atypical Strain of *Actinomyces naeslundii*. *Sabouraudia* 3, 26 - 29 (1963)
- BUCHANAN, B.B. and PINE, L.: Path of Glucose Breakdown and Cell Yields of a Facultative Anaerobe, *Actinomyces naeslundii*. *J. gen. Microbiol.* 46, 225 - 236 (1967)
- CRITCHLEY, P.: The Microbiology of Dental Plaque with Special Reference to Polysaccharide Formation. *Dtsch. zahnärztl. Z.* 26, 1155 - 1161 (1971)
- CRITCHLEY, P., SAXTON, C.A. and KOLENDO, A.B.: The Histology and Histochemistry of Dental Plaque. *Caries Res.* 2, 115 - 129 (1968)
- CRITCHLEY, P. and SAXTON, C.A.: The Metabolism of Gingival Plaque. *Int. dent. J.* 20, 408 - 425 (1970)
- DALLMEIER, E.: Vergleichende Untersuchungen über den Glukose- und Hexitstoffwechsel von Plaquesstreptokokken. *Math.-Naturwiss. Diss., Erlangen-Nürnberg* 1970
- DALLMEIER, E., BESTMANN, H.J. und KRÖNCKE, A.: Über den Abbau von Glukose und Sorbit durch Plaques-Streptokokken. *Dtsch. zahnärztl. Z.* 25, 887 - 898 (1970)
- DELLEBARRE, C.W., FRANKEN, H.C.M., CAMP, P.J.M. and HOEVEN, J.S. VAN DER: Determination of Organic Acids in Dental Plaque by Isotachophoresis. *J. dent. Res.* 56, Spec. Iss. A 313 (1977)
- DISTLER, W.: Modifizierte Darstellung von Fettsäure-2-naphtacyl-estern und ihre Fluoreszenzdetektion in der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie. *J. Chromatogr.* 192, 240 - 246 (1980)
- DISTLER, W.: Pers. Mitteilung 1981
- DISTLER, W. und KRÖNCKE, A.: Intra- und extrazelluläres Säurespektrum von in vitro inkubierter Plaque. *Dtsch. zahnärztl. Z.* 33, 629 - 633 (1978)
- DISTLER, W. und KRÖNCKE, A.: Der Stoffwechsel isolierter Streptokokken und Plaque im Vergleich. *Dtsch. zahnärztl. Z.* 34, 162 - 164 (1979)
- DISTLER, W., OTT, K. und KRÖNCKE, A.: Wechselwirkungen von *Streptococcus mutans*, *Actinomyces* und *Veillonella* in vitro - ein vereinfachtes Modell für den Kohlenhydratmetabolismus in der Plaque. *Dtsch. zahnärztl. Z.* 35, 548 - 553 (1980)

- EGELBERG, J.: A Review of the Development of Dental Plaque.
in: McHUGH, W.D. (hrsg.): Dental Plaque,
E. + S. Livingstone Ltd., Edinburgh and London 1970
- ENGLANDER, H.R., CARTER, WM.J. and FOSDICK, L.S.: The Formation of Lactic
Acid in Dental Plaques. III. Cariesimmune Individuals.
J. dent. Res. 35, 792 - 799 (1956)
- GEDDES, D.A.M.: The Production of L(+) and D(-) Lactic Acid and
Volatile Acids by Human Dental Plaque and the Effect
of Plaque Buffering and Acidic Strength on pH.
Arch. oral Biol. 17, 537 - 545 (1972)
- GEDDES, D.A.M.: Acids Produced by Human Dental Plaque Metabolism
in situ.
Caries Res. 9, 98 - 109 (1975)
- GEDDES, D.A.M. and GILMOUR, M.N.: The Reproducibility of Acid Production
by Human, Unhomogenized, Dental Plaques.
J. dent. Res. 48, 1106 (1969)
- GEHRING, F.: Über das Säurebildungsvermögen und die Lebensfähigkeit
von Plaquestreptokokken bei Rohrzuckerkonzentrationen
von 5 - 70 %.
Dtsch. zahnärztl. Z. 24, 196 - 202 (1969)
- GIBBONS, R.J. and SOCRANSKY, S.S.: Intracellular Polysaccharide Storage
by Organisms in Dental Plaques.
Arch. oral Biol. 7, 73 - 80 (1962)
- GILMOUR, M.N. and POOLE, A.E.: The Fermentative Capabilities of Dental
Plaque.
Caries Res. 1, 247 - 260 (1967)
- GILMOUR, M.N., GREEN, G.C., ZAHN, L.M., SPARMANN, C.D. and PEARLMAN, J.:
The C₁ - C₄ Monocarboxylic and Lactic Acids in Dental
Plaques Before and after Exposure to Sucrose in vivo.
In: STILES, H.M., LOESCHE, W.J. and O'BRIEN, T.C.:
Proceedings "Microbial Aspects of Dental Caries".
Vol. V, 539 - 556 (1979)
- GRAF, H. and MUHLEMANN, H.R.: Telemetry of Plaque pH from Interdental Area.
Helv. odont. Acta 10, 94 - 101 (1966)
- GUGGENHEIM, B.: Streptococci of Dental Plaques.
Caries Res. 2, 147 - 163 (1968)
- JENKINS, G.N.: The Mode of Formation of Dental Plaque.
Caries Res. 2, 130 - 138 (1968)
- JOHNS, A.T.: The Mechanism of Propionic Acid Formation by
Propioni Bacteria
J. gen. Microbiol. 5, 337 - 345 (1951)

- KEYES, P.H.: Recent Advances in Dental Caries Research. Bacteriology. Bacteriological Findings and Biological Implications. Int. dent. J. 12, 443 - 464 (1962)
- KLEINBERG, I.: Formation and Accumulation of Acid on the Tooth Surface. J. dent. Res. 49, 1300 - 1317 (1970)
- KONIG, K.G.: Karies und Kariesprophylaxe. Goldmann, München 1971
- KRASSE, B.: The Proportional Distribution of *Sc. salivarius* and Other Streptococci in Various Parts of the Mouth. Odont. Revy 5, 203 (1954)
- LEACH, S.A., CRITCHLEY, P., KOLENDO, A.B. and SAXTON, C.A.: Salivary Glycoproteins as Components of the Enamel Integuments. Caries Res. 1, 104 - 111 (1967)
- MIKX, F.H.M. and HOEVEN, J.S. VAN DER: Symbiosis of *Streptococcus mutans* and *Veillonella alcalescens* in Mixed Continuous Cultures. Arch. oral Biol. 20, 407 - 410 (1975)
- MINAH, G.E. and LOESCHE, W.J.: Development of Methods to Analyze Sucrose Metabolism by Small Dental Plaque Suspensions. In: STILES, H.M., LOESCHE, W.J. and O'BRIEN, T.C.: Proceedings "Microbial Aspects of Dental Caries". Vol. II, 491 - 520 (1976)
- MOORE, B.W., CARTER, WM.J., DUNN, J.K. and FOSDICK, L.S.: The Formation of Lactic Acid in Dental Plaques. I. Caries-Active Individuals. J. dent. Res. 35, 778 - 785 (1956)
- MUNTZ, J.A.: Production of Acids from Glucose by Dental Plaque Material. J. Biol. Chem. 148, 225 (1943)
- NEFF, D.: Acid Production from Different Carbohydrate Sources in Human Plaque in situ. Caries Res. 1, 78 - 87 (1967)
- ORLAND, F.J., BLAYNEY, J.R., HARRISON, R.W., REYNIERS, J.A., TREXLER, P.C., WAGNER, M., GORDON, H.A. and LUCKEY, T.D.: Use of the Germfree Animal Technic in the Study of Experimental Dental Caries. I. Basic Observations on Rats Reared Free of All Microorganisms. J. dent. Res. 33, 147 - 174 (1954)
- ORLAND, F.J., BLAYNEY, J.R., HARRISON, R.W., REYNIERS, J.A., TREXLER, P.C., ERVIN, R.F., GORDON, H.A. and WAGNER, M.: Experimental Caries in Germfree Rats Inoculated with Enterococci. J. Am. Dent. Assoc. 50, 259 - 272 (1955)

- RAAB, E.: Untersuchungen zum Glukosestoffwechsel oraler Aktinomyzeten.
Med. Diss., Erlangen-Nürnberg 1981
- RANKE, B., BRAMSTEIT, F. und NAUJOKS, R.: Untersuchungen mit markierten Verbindungen über den Kohlenhydratabbau in den Plaques.
Adv. Fluor. Res. Dent. Caries Prev. 2, 189 - 193 (1964)
- RANKE, E., RANKE, B., AHRENS, G. und HEESCHEN, W.: Plaqueflora und Zahnkaries. 1. Mitteilung: Vorkommen α -hämolyisierender und vergrünender Streptokokken.
Dtsch. zahnärztl. Z. 22, 883 - 890 (1967)
- RITZ, H.L.: Microbial Population Shifts in Developing Human Dental Plaque
Arch. oral Biol. 12, 1561 (1967)
- ROLLA, G.: Adsorption of Salivary Glycoproteins and Bacteria to Hydroxylapatite.
Colloques internationaux C.N.R.S. 230, 459 (1973)
zit. in BOSSMANN 1979a
- SAUERWEIN, E.: Kariologie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974
- SAXTON, C.A.: Scanning Electron Microscope Study of the Formation of Dental Plaque.
Caries Res. 7, 102 - 119 (1973)
- STEPHAN, R.M.: Changes in Hydrogen-Ion Concentration on Tooth Surfaces and in Carious Lesions.
J. Am. Dent. Assoc. 27, 718 - 723 (1940)
- TYLER, J.E.: Quantitative Determination of Organic Acid Residues in Carious Human Enamel.
Caries Res. 6, 275 (1972)
- TYLER, J.E.: Occurrence of Volatile Acid Residues in the Oral Environment.
Caries Res. 9, 310 - 311 (1975)
- WOOD, J.M.: The Amount, Distribution and Metabolism of Soluble Polysaccharides in Human Dental Plaque.
Arch. oral Biol. 12, 849 - 858 (1967)
- WYNN, W., HALDI, J. and LAW, M.L.: Enamel Demineralisation.
Dent. Progr. 1 (1960) 8/4 zit. in SAUERWEIN 1974

Ich danke

- Herrn Prof. Dr. Kröncke für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit zur Durchführung der Versuche in den biochemischen Laboratorien der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie.
- Herrn Dr. Distler und seinen Mitarbeiterinnen für die freundliche Unterstützung bei meiner experimentellen Arbeit.
- Schwester Rosl für die ständige Hilfsbereitschaft bei der Abnahme der Plaqueproben.
- allen Probanden, die durch ihre Bereitschaft zur Mitwirkung diese Arbeit letztlich erst ermöglichten.

Lebenslauf

02.05.1955	Geboren in Schwandorf als erster Sohn des Bankkaufmanns Adolf Lang und seiner Ehefrau Felicitas
ab September 1961	Besuch der Lindenvolksschule in Schwandorf
September 1965	Übertritt in das Gymnasium Schwandorf
November 1966 - Januar 1972	Besuch des Schiller-Gymnasiums Hof
Januar 1972 - Juni 1974	weiterer Besuch des Gymnasiums Schwandorf
Juni 1974	Abitur
ab Juli 1974	Grundwehrdienst beim Bundesgrenzschutz in Schwandorf
Mai 1976	Aufnahme des Studiums der Zahnmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen
März 1977	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
September 1978	Zahnärztliche Vorprüfung
Juli 1981	Zahnärztliche Prüfung

